Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. H. Herken

RENALE WIRKUNGEN DES d-ALDOSTERONS UND SEINES ANTAGONISTEN SPIRONOLACTON

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1966

vorgelegt von
Peter Marx
aus Berlin

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. H. Herken

RENALE WIRKUNGEN DES d-ALDOSTERONS UND SEINES ANTAGONISTEN SPIRONOLACTON

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Marx
aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med. Wilhelm Maßhoff

Referent: Professor Dr. med. Hans Herken

Korreferent: Priv. Doz. Dr. med. Helmut Coper

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 4.2.1966

MEINEN ELTERN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546527_0036

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	5
Methodik	6
Adrenalektomie	6
Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen zwischen Aldosteron und Antialdosteron im modifizierten Kagawa-Test	6
Versuchsanordnung zur Bestimmung des Wirkungseintritts und der Wirkungsdauer des d-Aldosterons und des Antagonisten Spironolacton	7
Bestimmung der Spirolactone in Plasma und Urin	8
Bestimmung der glomerulären Filtration	9
Bestimmung der Eiweißbindung des Antialdosterons	10
Bestimmung der tubulären Sekretion von Spirolacton im Stop-Flow-Experiment	10
PAH - Bestimmung	11
Ergebnisse	13
Dosis-Wirkungs-Beziehungen von d-Aldosteron im modifizierten Kagawa-Test	13
Prüfung der Wirkungsintensität von Spironolacton (Sc 9420)	13
Natriumbilanz adrenalektomierter Ratten bei Steigerung der Kochsalzeinfuhr	14
Kaliumausscheidung adrenalektomierter Ratten bei Steigerung der Kochsalzzufuhr	15
Die Wasserbilanz adrenalektomierter Ratten bei Steigerung der Kochsalzzufuhr	16
Die renale Wirkung des Aldosterons bei Steigerung der NaCl-Einfuhr	16
Der Einfluß des Aldosterons auf die Kaliumausscheidung adrenalektomierter Ratten	17
Die Wasserbilanz adrenalektomierter Ratten bei Zufuhr von Aldosteron	18

Seite

Der Einfluß von Aldosteron auf die tubuläre Rückgewinnung von Natriumionen 18

Der Einfluß von Spironolacton (Sc 9420) auf die renalen Wirkungen des Aldosterons 18

Wirkungsintensität und renale Elimination der Spirolactone 19

Lokalisation der tubulären Sekretion der Spirolactone im Stop-Flow-Experiment 20

Diskussion 20

Zusammenfassung 26

Literaturverzeichnis 28

Einleitung

Zahlreiche Autoren haben festgestellt, daß Aldosteron die Na^+-Ausscheidung bei Versuchstieren sowie Menschen reduziert und die Elimination der Kaliumionen mit dem Harn steigert (SIMPSON, TAIT, WETTSTEIN, NEHER, v.EUW und REICHSTEIN 1953; GAUNT, RENZI und CHART 1955; PETERS 1960; GROSS 1961). Der Wirkungsmechanismus des Hormons ist nicht geklärt. WILBRAND (1959, 1959a, 1963) nimmt an, daß die Verbindung als Carrier fungiert, der Na^+- und K^+-Ionen gegen ein Konzentrationsgefälle durch die Zellmembran transportiert.
Der tubuläre Effekt des Aldosterons kann durch Spirolactone aufgehoben werden (KAGAWA, CELLA und van ARMAN 1957, LIDDLE 1957, 1960), unter denen das Spironolacton 3-(3-keto 7α-acetylthio-17β-hydroxy-4-androsten-17α-yl)-Propionsäureγ-Lacton (Aldactone (WZ))in die Therapie von Erkrankungen mit erhöhter Aldosteronaktivität eingeführt wurde. Die pharmakologische Wirkung der Verbindungen wird durch einen kompetitiven Antagonismus gegenüber dem Aldosteron erklärt (KAGAWA, STURTEVANT und van ARMAN 1959).

Die renale Aktivität des Aldosterons und seiner Antagonisten wurde bisher fast ausschließlich mit Hilfe des von KAGAWA, SHIPLEY und MEYER (1952) angegebenen Verfahrens bestimmt. Die kurzfristigen Versuche lassen aber keine Rückschlüsse auf die Bedeutung des Aldosteron für die Oedempathogenese zu, da die beim Patienten gegebenen Bedingungen durch eine lang anhaltende vermehrte Inkretion des Hormons charakterisiert sind. Der Effekt des Antialdosterons kann nur summarisch erfaßt werden, Wirkungseintritt und Wirkungsdauer der Substanz können nicht bestimmt werden. Wir haben deshalb ein Verfahren entwickelt, mit dem die tubuläre Rückgewinnung der Natriumionen unter dem Einfluß einer kontinuierlichen Aldosteron-Zufuhr geprüft wird. Unter diesen Bedingungen haben wir auch den Effekt des Aldosteronantagonisten Spironolacton und die Ausscheidung bzw. die des dethioacetylierten Metaboliten gemessen.
Schließlich wurde der Mechanismus des renalen Transports dieser Substanzen in Clearance- und Stop-Flow-Untersuchungen untersucht.

Methodik

In allen Versuchen wurden männliche Ratten (Sprague Dawley) mit einem Gewicht zwischen 130 und 180 g verwendet.

Adrenalektomie

Die Nebennieren wurden in Äthernarkose durch doppelseitigen Paravertebralschnitt freigelegt und stumpf mit zwei gebogenen Pincetten vom Peritonealraum her entfernt. Nach makroskopischer Beurteilung der Vollständigkeit des Präparates wurde die Rückenmuskulatur vernäht und die Haut mit Michelklammern adaptiert. Nach der Operation erhielten die Tiere Trockenfutter und 5%ige Glucoselösung ad libitum.

Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen zwischen Aldosteron und Spironolacton im modifizierten Kagawa-Test. (KAGAWA, SHIPLEY, MEYER 1952)

24 Stunden nach Adrenalektomie erhielten die Tiere 20 ml/kg einer 0.85%igen NaCl-Lösung durch orale Infusion. d-Aldosteron wurde jeweils in 0.1 ml Aqua dest. gelöst und subcutan injiziert. Die Spironolacton -Dosen wurden in 1 ml Ol. rapae gelöst und ebenfalls durch subcutane Injektion verabreicht. Kontrolltiere erhielten entsprechende Mengen der Lösungsmittel. Die Tiere wurden dann zur Urinsammlung in Plexiglaskäfige gesetzt, deren Konstruktion in der Arbeit von HERKEN, SENFT, WILUTZKY (1956) angegeben ist. Nach 4 Stunden wurde der Penis mit einer Klemme abgeklemmt und das Tier dekapitiert. Darauf wurde die Harnblase freigelegt, unterhalb des Sphincter int. abgeklemmt, herauspräpariert, und ihr Inhalt mit dem zuvor ausgeschiedenen Urin des Tieres vereinigt. Zur flammenphotometrischen Bestimmung von Na^+ und K^+ wurden aliquote Teile des Harns mit Aqua dest. 1/10 und 1/100 verdünnt und in einem Beckmann-Spektrophotometer, Modell DU, gemessen, das mit einem Zusatzgerät zur Flammenphotometrie sowie einem Sekundär-Elektronen-Vervielfältiger ausgestattet war. Die höchsten Werte der Na^+- und K^+-Eichreihen enthielten 5 µval Na^+/ml bzw. 1,2 µval K^+/ml.

Versuchsanordnung zur Bestimmung des Wirkungseintritts und der Wirkungsdauer des d-Aldosteron und des Antagonisten-Spironolacton.

Sprague Dawley-Ratten wurden 20 Stunden vor Infusionsbeginn in Evipan-Narkose adrenalektomiert. An den Oberkieferzähnen wurden Stahlkronen mit einem seitlich angeschweißten Kanülenrohr befestigt. Hieran wurde bei Infusionsbeginn ein 5 cm langer Polyäthylenschlauch mit einer Überwurfmutter befestigt, der aus einer am Boden des Plexiglaskäfigs befindlichen Aussparung geleitet wurde. Außerhalb des Käfigs sicherten wir den Schlauch mit einer Plexiglasmutter, die einen größeren Durchmesser hatte als die Bodenaussparung des Käfigs. Diese Anordnung ermöglicht, daß sich die Tiere bewegen können, hindert sie aber daran, sich herumzudrehen. Weitere Einzelheiten des Verfahrens sind in der Arbeit von HERKEN, SENFT, SCHWARZ und MERKER (1963) angegeben. Die Schwanzvenen der Tiere wurden durch Erwärmen in Wasser (ca. 40°C) dilatiert und mit einer nabenlosen Kanüle (1/12 mm) punktiert, über deren freies Ende ein Polyäthylenschlauch gesteckt war. Zur Punktion befestigten wir die Kanüle in einer Kocherklemme, deren freier Zahn abgeschliffen war. Nach Entfernung der Klemme wurden Schlauch und Kanüle durch einen lockeren zirkulären Heftplasterstreifen am Schwanz fixiert.

Zur Infusion benutzten wir die von HERKEN, SENFT und WILUTZKY (1956) angegebene Infusionsapparatur. Als Infusionslösung verwendeten wir 0,05, 0,2, 0,9 und 1,2%ige NaCl-Lösung; die hypotonischen NaCl-Lösungen wurden durch Zugabe entsprechender Glucose-Mengen auf eine Osmolalität von 308 µosmol/ml eingestellt. Die Infusionsgeschwindigkeit betrug 5 ml/Tier/Stunde. Anstelle einer einmaligen Injektion erhielten die Tiere Aldosteron kontinuierlich zugeführt. Die Dosis betrug 0,25 µg/Tier/Std. Sie war in 5 ml der Infusionsflüssigkeit gelöst. Spironolacton wurde in einer Dosis von 6 mg/Tier in 1 ml Ol. rapae gelöst und 2 Std. nach Infusionsbeginn subcutan injiziert. Der Urin wurde stündlich gesammelt, Na^+ und K^+ bestimmten wir flammenphotometrisch nach entsprechender Verdünnung.

Bestimmung der Spirolactone in Plasma und Urin

Wir verwendeten hierfür die von GOCHMAN und GANTT (1962) angegebene Methode. Sie beruht auf der Messung der Fluoreszenz der Verbindungen im sauren Milieu bei Anregung durch Licht niedriger Wellenlänge.

Reagenzien Methylenchlorid
0.1 n NaOH
65%ige (Vol. + Vol.) wäßrige H_2SO_4

Verfahrensgang

0.2 ml Plasma bzw. Urin werden in einem mit Schliffstopfen versehenen 50 ml Zentrifugenglas mit Aqua quart.dest. ad 5 ml aufgefüllt und zusammen mit 15 ml Methylenchlorid 20 Min. lang geschüttelt. Danach wird bei 3000 U/Min. zentrifugiert, die überstehende wäßrige Phase abgesaugt und verworfen. Nach Zugabe von 1 ml 0.1 n NaOH wird wiederum 20 Min. lang geschüttelt, anschließend zentrifugiert und der wäßrige Überstand abgesaugt und verworfen. Von der verbleibenden Methylenchloridphase werden 10 ml in ein anderes Zentrifugenglas pipettiert, in das vorher 2 ml einer 65 Vol. %igen wäßrigen H_2SO_4 gegeben worden sind. Nach erneutem Schütteln und Zentrifugieren wird die jetzt überstehende Methylenchloridphase abgesaugt und verworfen. Die verbleibende Schwefelsäurephase wird bei Raumtemperatur 30 Min. lang stehengelassen und die in ihr enthaltene Spirolacton-Konzentration fluometrisch bestimmt. Wir verwendeten hierfür ein Aminco-Bowman-Spektrofluorometer.

Anregendes Maximum: 465 mμ (unkorrigierte Werte)
Fluoreszenzmaximum: 540 mμ (unkorrigierte Werte)

(Abb. 1)

Aufstellung einer Spirolacton-Eichreihe

Stammlösung 20 mg SC 9376 3-(3-oxo-17β-hydroxy- 4,6- androstandien - 17α-yl) -Propionsäure γ Lacton
10 ml Äthanol
ad 1000 ml Aqua quart.dest.

Von dieser Stammlösung wurden folgende Verdünnungen hergestellt und als Eichreihe benutzt:

0.01 /ug/ml
0.02 /ug/ml
0.04 /ug/ml
0.10 /ug/ml

Bestimmung der glomerulären Filtration

Als Maß für die glomeruläre Filtration (GFR) benutzten wir die Inulin Clearance. Wir injizierten den Tieren je 7.5. ml/kg einer 2%igen Inulin-Lösung intraperitoneal und subcutan. 15 Minuten später begann die Clearance-Periode von 20 Minuten, an deren Ende den Tieren der Penis mit einer Kocherklemme abgeklemmt wurde. Danach dekapitierten wir die Tiere, fingen ihr Blut in Zentrifugengläsern auf, die mit einem Silikonfilm ausgekleidet und mit einer Heparinlösung (Calciumheparinat 1%ig) besprüht worden waren. Die Gläser wurden bei 3000 U/Min. 10 Min. lang zentrifugiert und das Plasma abpipettiert. Der während der Clearance-Periode spontan gelassene Harn wurde mit dem Blasenurin vereinigt und ad 25 ml aufgefüllt. Die Inulin-Konzentration bestimmten wir nach dem von B.WAHLER (1956) angegebenen Verfahren, das im Prinzip auf der Ihl'schen Resorcin-Farbreaktion auf Hexosen beruht. Sie wird nach Enteiweißung, alkalischer Autoxydation störender Oligosaccharide und saurer Hydrolyse des alkalistabilen Polysaccharids ausgeführt, wobei die Hydrolyse in konzentrierter HCl sehr rasch verläuft und mit der eigentlichen Farbreaktion gekoppelt werden kann.

Reagenzien

1. 0.75 n NaOH
2. 4.25 n NaOH
3. 0.28 n $ZnSO_4$ + 0.25 n HCl
4. 1.0 n HCl
5. a) 0.06 m Thioharnstoff + 0.002 m Resorcin in konz. HCl
   b) 0.1 m $FeCl_3$ in konz. HCl

   Unmittelbar vor Gebrauch sind 0.1 ml der Lösung 5b) auf 100 ml Resorcin-Reagenz (5a) zuzusetzen.

Verfahrensgang

0.4 ml Plasma bzw. Urin werden in einem 10 ml-Reagenzglas mit Schliffstopfen zusammen mit 1.5 ml 0.75 n NaOH für 10 Min. auf 100°C (Wasserbad) erhitzt und danach auf etwa 20°C abgekühlt. Dann werden 2.5 ml 0.28 n $ZnSO_4$ + 0.25 n HCl zugegeben, kräftig geschüttelt, für etwa 30 Min. bei Raumtemperatur stehengelassen und dann bei 3000 U/Min. zentrifugiert. Von der überstehenden klaren Flüssigkeit werden 2 ml in ein Reagenzglas überführt und 4 ml des aus Reagenz 5a und 5b hergestellten Gemisches zugegeben, 9 Min. auf 78°C (Thermostat) erhitzt (bei kleinen Oberflächen kann die Verdunstung vernachlässigt werden), sofort in kaltem Wasser unter Schütteln auf etwa 20°C abgekühlt und innerhalb von 30 Min. bei 5150 Å kolorimetriert.

Bestimmung der Eiweißbindung des Antialdosterons.

Die Eiweißbindung des Spirolactons bestimmten wir durch Dialyse von Plasma gegen Phosphatpuffer (pH 7,2).
4 Stunden vor Dekapitation injizierten wir einer Sprague Dawley-Ratte 12 mg Spironolacton (SC 9420) in 2 ml Ol. rapae. Nach Tötung des Tieres fingen wir das Blut in heparinierten und silikonierten Zentrifugenröhrchen auf, zentrifugierten 10 Min. lang bei 3000 U/min und bestimmten die in einem aliquoten Teil des Plasma enthaltene Spirolacton-Konzentration. Das restliche Plasma wurde 16 Stunden gegen Phosphatpuffer (pH 7.2) dialysiert. Darauf wurden die Spirolacton-Konzentrationen im Dialysat und im dialysierten Plasma gemessen. Die Eiweißbindung errechnet sich nach der Formel:

$$\text{Eiweißbindung (in \%)} = \frac{\text{Plasmakonz. n. d. Dialyse - Konz. d. Dialysats}}{\text{Plasmakonzentration n. Dialyse}} \times 100$$

Bestimmung der tubulären Sekretion von Spirolacton im Stop-Flow-Experiment

Zur Prüfung der Frage, ob und in welchem Abschnitt des Nephrons Spirolactone tubulär sezerniert werden, verwendeten wir die von MALVIN, SULLIVAN und WILDE (1957) und MALVIN, WILDE und SULLIVAN (1958) ausgear-

beitete Stop-Flow-Methode. Narkotisierten Tieren wird durch den operativ freigelegten Ureter ein Polyäthylenkatheter soweit wie möglich in das Nierenbecken hinaufgeschoben. Danach wird eine osmotische Diurese durch intravenöse Dauerinfusion einer Mannitol-Lösung eingeleitet, der zur Prüfung und Lokalisation tubulärer Funktionen Inulin, Paraaminohippursäure und NaCl hinzugefügt werden. Nach Erreichen eines konstanten Harnflusses wird der Ureter für eine bestimmte Zeit abgeklemmt. Damit stagniert der Harnfluß im tubulären System. Aufgrund der längeren Verweildauer prägen sich die Funktionen der Tubulus-Zellen stärker aus. Nach Eröffnung des Ureter-Katheters wird der Harn fraktioniert aufgefangen und auf seinen Gehalt an Inulin, PAH, Na^+ und Spirolactone untersucht.

Die Analyse der p-Amino-Hippursäure dient zur Charakterisierung der proximalen Tubulusfunktionen. Zu ihrer Bestimmung verwendeten wir das ursprünglich von BRATTON und MARSHALL (1939) in der Modifikation von SMITH, HW et al. (1949) angegebene Verfahren. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Diazotierung der p-Aminogruppe der PAH mit HNO_2 und, nach Zerstörung der restlichen HNO_2 durch Ammoniumsulfamat, in einer Koppelung mit N- (1-naphthyl-) aethylendiamin-dihydrochlorid. Die entstehende Verbindung ist dann quantitativ bei 540 mμ kolorimetrisch zu bestimmen.

Reagenzien

a) 4%ige Trichloressigsäure
b) 0.5% Ammoniumsulfamat
c) 0.1% $NaNO_2$
d) 0.1% N- (1-naphthyl-) aethylendiamin-dihydrochlorid

Außer der Trichloressigsäure wurden die Lösungen für jede Bestimmung neu angesetzt.

Arbeitsgang

0.5 ml des 1/100 verdünnten Plasmas bzw. Urins werden mit 2.5 ml 4%iger Trichloressigsäure versetzt. Das ausgefallene Eiweiß wird abzentrifugiert. 0.5 ml des Überstandes werden in ein Reagenzglas pipettiert und dann 0.3 ml $NaNO_2$, 0.3 ml Ammoniumsulfamat und 1.5 ml N-(1-naphthyl-) aethylen-

diamindihydrochlorid im Abstand von 3 Min. unter Schütteln zugegeben. Nach weiteren 10 Min. wird der gebildete rote Farbstoff in einem Beckman-Spektrophotometer DB bei einer Wellenlänge von 540 m µ gegen Aqua dest. gemessen. Zu jeder Messung stellten wir eine Eichreihe her, die folgende PAH-Konzentrationen hatte:

0.5 µg/ml
1.0 µg/ml
1.5 µg/ml

Für die Eichlösung wurde die PAH in 2%iger Na_2SO_4 gelöst.

Ergebnisse

Dosiswirkungsbeziehungen von d-Aldosteron im modifizierten Kagawa-Test

Bevor wir den Antagonismus des Spironolactons gegenüber dem Aldosteron prüften, mußten wir zunächst die Dosiswirkungsbeziehungen des Agonisten, d.h. des Mineralocorticoids, unter den gewählten Versuchsbedingungen kennenlernen. Die natriumretinierende Wirkung des d-Aldosterons wird nahezu verdoppelt, wenn die Dosis des subcutan injizierten Hormons von 0,05 auf 0,1 µg pro Tier gesteigert wird. In diesem Bereich besteht damit eine annähernd lineare Beziehung. Darauf flacht sich die Dosiswirkungskurve asymptotisch ab. Durch eine Erhöhung der Aldosteron-Dosen bis zu 1,0 µg pro Tier läßt sich keine Steigerung der Natriumretention erzielen, die den bereits durch 0,1 µg Aldosteron erzeugten Effekt statistisch gesichert übertrifft (Abb. 2).

Die kaliumeliminierende Wirkung des Aldosterons erreicht nach Injektion von 0,5 µg einen Wert, der bei Erhöhung der Hormondosis nicht mehr überschritten wird.

Prüfung der Wirkungsintensität von Spironolacton (SC 9420)

Die natriumretinierende Wirkung von 0,05 µg Aldosteron wird in der gewählten Versuchsanordnung durch 6 mg Spironolacton aufgehoben. Der Effekt von 0,1 µg Aldosteron wird durch die gleiche Dosis noch fast vollständig blockiert. Die Wirkung der konstanten Spironolacton-Dosis nimmt aber immer stärker ab, wenn die Aldosteron-Dosis auf 0,5 und 1,0 µg erhöht wird (siehe Abb. 2).

Die Berechnung der Na^+/K^+ Quotienten zeigt ebenfalls, daß der Spironolactoneffekt mit steigender Aldosteron-Dosis abnimmt, obwohl die Wirkung des Mineralocorticoids bereits bei einer Dosis von 0,1 µg Aldosteron ihr Maximum erreicht (siehe Abb. 2).

Natriumbilanz adrenalektomierter Ratten bei Steigerung der Kochsalzeinfuhr

Bei der Ausarbeitung einer Versuchsanordnung zur Messung der renalen Wirkungen einer kontinuierlichen Aldosteronzufuhr haben wir zunächst die Natriumausscheidung adrenalektomierter Ratten bei verschiedenem Kochsalzgehalt der Infusionslösung geprüft.

1) Versuche mit 0,05%iger NaCl-Lösung.
Die Tiere scheiden zunächst weniger Natrium mit dem Harn aus als sie durch die intravenöse Infusion erhalten. Die Natriumausfuhr steigt aber an und erreicht in der vierten Stunde einen Wert, welcher der Einfuhr in dem gleichen Zeitabschnitt entspricht. Anschließend werden die anfangs retinierten Natriumionen eliminiert. Die Bilanz war nach 8 Stunden ausgeglichen. Da die Natriumausscheidung dann aber nicht wieder auf die pro Zeiteinheit zugeführte Natriummenge absinkt, resultiert eine negative Natriumbilanz während des zehnstündigen Versuches (Abb. 3, Tab. 1). Die Flüssigkeitsbilanz ist trotz des Natriumverlustes positiv.

2) Versuche mit 0,2%iger NaCl-Lösung.
Die Erhöhung der Natriumkonzentration auf das 4-fache überschreitet bereits die Natriumtoleranz der adrenalektomierten Tiere. Die Natriumausscheidung fällt in den ersten 3 Stunden ab, steigt dann an, erreicht aber erst zwischen der 9. und 10. Stunde nach Infusionsbeginn einen Wert, der nur noch wenig unterhalb der während der gleichen Versuchsperiode zugeführten Natriummenge liegt. Die zuvor retinierten Natriumionen werden aber nicht eliminiert, so daß die Natriumbilanz während des 10-stündigen Versuchs positiv bleibt (Abb. 3, Tab. 1). Die Tiere scheiden zwar mehr Natriumionen aus als bei Infusion von 0,05%iger Kochsalzlösung. Die Natriumausfuhr steigt aber nicht entsprechend der erhöhten Einfuhr an.

Bei einigen Versuchen haben wir die Infusionsdauer von 10 auf 20 Stunden verlängert. Wir wollten damit prüfen, ob die Natriumbilanz zu einem späteren Zeitpunkt ausgeglichen werden kann. Dies ist jedoch nicht der Fall. Zwischen der 13. und 15. Stunde werden zwar mehr Natriumionen mit dem

Harn eliminiert als während der gleichen Zeit zugeführt wurden. Die Mehrausscheidung reicht aber zur Beseitigung der Natriumretention nicht aus (Tab. 4).

3) Versuche mit 0,9%iger Kochsalzlösung.
Erwartungsgemäß trat auch unter diesen Bedingungen eine Kochsalzretention auf. Die Menge der in einer Stunde ausgeschiedenen Natriumionen steigt zwar mit der Dauer des Versuchs an, die stündliche Einfuhr wurde aber nicht erreicht.

Ein Vergleich mit der Natriumbilanz von Tieren nach Zufuhr von 0,2%iger Kochsalzlösung zeigt, daß die Natriumausscheidung auf mehr als das 6-fache ansteigt, wenn die Natriumeinfuhr 4 1/2-mal größer wird. Die absolute Menge der ausgeschiedenen Natriumionen wurde erhöht, der Prozentsatz der im Vergleich zur zugeführten Natriummenge retinierten Natriumionen jedoch von 55% auf 36% erniedrigt (Abb. 3, Tab. 1).

4) Versuche mit 1,2%iger NaCl-Lösung.
Die Natriumretention war überraschenderweise absolut geringer, wenn die adrenalektomierten Tiere eine 1,2%ige Kochsalzlösung anstelle einer 0,9%igen durch intravenöse Zufuhr erhielten. 80,2% der Natriumeinfuhr wurden während der 10stündigen Versuchsdauer im Endharn ausgeschieden. Bei Gabe der isotonischen Salzlösung waren es nur 64%. Die Natriumausfuhr übertraf bereits von der 6. Stunde an die zu dem gleichen Zeitpunkt infundierte Na^+-Menge. Die zuvor retinierten Natriumionen konnten allerdings bis zur 10. Stunde nicht quantitativ eliminiert werden (Abb. 3, Tab. 1).

Die Kaliumausscheidung adrenalektomierter Ratten
bei Steigerung der Kochsalzzufuhr

Die Ausfuhr der Kaliumionen wurde erhöht, wenn die Natriumausscheidung mit zunehmender Kochsalzzufuhr anstieg. Wurde die Natriumeinfuhr von 428 auf 1 712 µval/10 Stunden gesteigert, so blieb der Na^+/K^+-Quotient annähernd konstant. Er stieg jedoch auf das 4- bis 5-fache an, wenn die Tiere eine 0,9- oder 1,2%ige Kochsalzlösung erhielten. Die Kaliumausfuhr nahm im Vergleich zur Natriumausscheidung nur noch geringfügig zu (Tab. 1).

Die Wasserbilanz adrenalektomierter Ratten
bei Steigerung der Kochsalzzufuhr

Die adrenalektomierten Ratten retinierten in allen Versuchen Wasser, selbst dann, wenn die Natriumbilanz bei Zufuhr der 0,05%igen NaCl-Lösung negativ war. Die Wasserausscheidung nahm bei Steigerung der Kochsalzkonzentration in der Infusionsflüssigkeit auf 0,2 und 0,9% zu. Die Zufuhr der 1,2%igen NaCl-Lösung hatte keine zusätzliche Verstärkung der Wasserretention zur Folge. (Tab. 1).

Die renale Wirkung des Aldosterons bei Steigerung der NaCl-Einfuhr

Wir haben zunächst geprüft, ob die Na^+-retinierende Wirkung des Aldosterons von der Kochsalzkonzentration der Infusionslösung bzw. der Natriumeinfuhr abhängt.

1) Versuche mit 0,05%iger NaCl-Lösung
Der Einfluß des d-Aldosterons auf die Natriumausscheidung macht sich nach einer Latenzzeit von 1 Stunde bemerkbar. In der 4. Stunde erreicht die Natriumelimination ein Minimum. Der hormonale Effekt (Verminderung der Na^+-Ausscheidung im Vergleich zu den Kontrollen) steigt aber noch weiter an und erreicht in der 10. Stunde ein Maximum (Abb. 5, Tab. 2).

2) Versuche mit 0,2%iger NaCl-Lösung
Unter dem Einfluß des Hormons lag das Minimum der Natriumausscheidung ebenfalls in der 4. Stunde. Die natriumretinierende Wirkung des Hormons war zu diesem Zeitpunkt aber noch relativ gering, da die unbehandelten Tiere ebenfalls wenig Natriumionen ausschieden. Die Natriumelimination der mit Aldosteron behandelten Tiere stieg aber langsamer an als die der Kontrollen, so daß der hormonale Effekt immer größer wurde und in der 10. Stunde sein Maximum erreichte. Ein Vergleich mit den Versuchen bei Zufuhr einer 0,05%igen Kochsalzlösung zeigt, daß die hormonale Wirkung nur ungefähr 1,7-mal größer wird, wenn die Kochsalzzufuhr auf das 4-fache gesteigert wird (Abb. 5, Tab. 2).

In einem Experiment haben wir die Versuchsdauer auf 20 Stunden verlängert. Hierbei stellten wir fest, daß die hormonal bedingte Natriumretention nach der 11. Stunde wieder abnimmt. In der 16. Stunde steigt die Natriumausscheidung sogar bis auf die bei den Kontrollen gemessenen Werte an. Die Aldosteronwirkung beträgt zwischen der 11. und 20. Stunde des Versuchs nur 42% der in den ersten 10 Stunden gemessenen (Tab. 4).

3. Versuche mit 0,9%iger Kochsalzlösung

Die durch das Hormon bedingte Natriumretention ist zwischen der 4. und 6. Stunde am stärksten. In der 10. Versuchsstunde hat die Natriumausscheidung einen Wert erreicht, der mit der Elimination der Kontrollen in dem gleichen Zeitabschnitt fast völlig übereinstimmt. Der 10-stündige hormonale Effekt steigt aber noch nicht einmal auf das doppelte an, wenn die Na^+-Zufuhr von 1 712 auf 7700 µval/10 Stunden erhöht wird. Die im Vergleich zur eingeführten Natriummenge auftretende Retention wird von 37% auf 17% erniedrigt (Abb. 5, Tab. 2).

4. Versuche mit 1,2%iger Kochsalzlösung.

Bei Infusion einer 0,05- bzw. 0,2%igen Kochsalzlösung wird die Natriumausscheidung unter dem Einfluß des Aldosterons unter die vor dem Wirkungseintritt des Steroids gemessenen Werte erniedrigt. Bei Gabe von 0,9 oder 1,2%iger Kochsalzlösung ist dies nicht mehr der Fall. Die Natriumelimination steigt unter diesen Bedingungen vom Beginn des Versuches an, allerdings langsamer als bei den Kontrollen. Das Maximum der hormonalen Leistung liegt wiederum in der 4. Stunde. Die aldosteronbedingte Natriumretention beträgt während des 10-stündigen Versuches 16,8% der Natriumeinfuhr. Dieser Wert entspricht dem bei Infusion von 0,9%iger Kochsalzlösung ermittelten (Abb. 5, Tab. 2).

Der Einfluß des Aldosterons auf die Kaliumausscheidung adrenalektomierter Ratten.

Die Kaliumausscheidung der adrenalektomierten Tiere wird durch das Hormon erwartungsgemäß gesteigert, und zwar um so mehr, je größer der natrium-

retinierende Effekt ist. Das Verhältnis der aldosteronbedingten Natriumretention zur Kaliummehrausscheidung bleibt unter den verschiedenen Versuchsbedingungen annähernd gleich (Tab. 2).

Die Wasserbilanz adrenalektomierter Ratten bei Zufuhr von Aldosteron

Die Flüssigkeitsausscheidung wird gegenüber der von Kontrollen nur relativ geringfügig reduziert, am stärksten noch bei Infusion von 0,9 und 1,2%iger Kochsalzlösung. Sie fiel hierbei um etwa 20% der während des 10stündigen Versuches bei den Kontrollen gemessenen Werte ab (Tab. 2).

Der Einfluß von Aldosteron auf die tubuläre Rückgewinnung von Natriumionen

Die Messung der Inulinclearance in der 3. Stunde des Infusionsexperiments mit 0,2%iger NaCl-Lösung zeigte, daß die glomeruläre Filtration durch Aldosteron geringfügig gesteigert war. Dennoch wurden weniger Natriumionen mit dem Harn ausgeschieden. Die Na^+-retinierende Wirkung des Hormons ist somit auf eine Steigerung der tubulären Rückgewinnung von Natriumionen zurückzuführen (Tab. 3).

Der Anstieg der Natriumausscheidung, der trotz konstanter Aldosteronzufuhr mit fortschreitender Versuchsdauer auftritt, scheint nicht nur auf einer weiteren Steigerung der glomerulären Filtration zu beruhen. Es wird vielmehr auch die prozentuale Rückgewinnung der filtrierten Natriumionen reduziert.

Der Einfluß von Spironolacton (SC 9420) auf die renalen Wirkungen des Aldosterons

Zur Prüfung der Wirkungsintensität und -dauer des Spironolactons verwendeten wir die im vorangegangenen Kapitel benutzte Versuchsanordnung, bei der die Tiere eine 0,2%ige NaCl-Lösung durch intravenöse Infusion erhielten. Spironolacton (6 mg/Tier) wurde 2 Stunden nach Infusionsbeginn subcutan injiziert. Seine Wirkung trat 3 Stunden später auf und erreichte in der 8. Stunde post inj. ein Maximum. Die aldosteronbedingte Natriumretention wird zu diesem Zeitpunkt um 76% reduziert. In der 12. Stunde post inj. ist die Wirkung des Antagonisten etwas geringer geworden. Der Aldosteroneffekt ist aber immer noch um mehr als die Hälfte reduziert. Der weitere Verlauf des Experiments ist zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit des Spironolactons

nicht mehr geeignet, da die Natriumausscheidung der mit Aldosteron behandelten Tiere sich von der der Kontrollen nur noch geringfügig unterscheidet. Die hormonal bedingte Natriumretention wird während der 12stündigen Versuchsperiode um 51% erniedrigt (Tab. 4).

Die natriumeliminierende Wirkung des Antialdosterons war von einer Reduktion der hormonal bedingten Kaliumverluste begleitet.

Die Wasserausscheidung der drei miteinander verglichenen Tiergruppen (Kontrollen, nach Zufuhr von Aldosteron und nach gleichzeitiger Gabe von Aldosteron und Spironolacton) war nicht verschieden. Die Wirkung des Mineralocorticoids und seines Antagonisten ist daher an der Höhe der Natriumkonzentration im Harn zu erkennen (Abb. 4). Bei dieser Auswertung wird ersichtlich, daß Aldosteron die Zeit verlängert, die benötigt wird, damit sich die Natriumkonzentration im Harn der Natriumkonzentration in der Infusionsflüssigkeit anpaßt. Der Einfluß des Spironolactons läßt sich an einer Verkürzung der dafür erforderlichen Zeit erkennen.

Wirkungsintensität und renale Elimination der Spirolactone.

Nach den Untersuchungen von GOCHMAN und GANTT wird der überwiegende Anteil des Spironolactons (SC 9420) in der Leber dethioacetyliert.

Bei der Analyse der Antialdosteronwirkung hatten wir festgestellt, daß das Maximum des pharmakologischen Effekts in der 8. Stunde nach subcutaner Applikation liegt. Die Messung der beiden Substanzen ergab, daß in dem gleichen Zeitraum auch die größte Menge der Pharmaka im Endharn erscheint. Danach bleibt die Ausscheidung bis zur 12. Stunde konstant (Tab. 4).

In den folgenden Versuchen haben wir uns mit dem Mechanismus der renalen Elimination dieser Substanzen beschäftigt. Clearance-Untersuchungen ergaben, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen eine größere Menge der beiden Spirolactone im Endharn ausgeschieden wird als durch Filtration in den Primärharn gelangt. Diese Differenz kann durch eine tubuläre Sekretion der Verbindungen erklärt werden (Tab. 5).

Lokalisation der tubulären Sekretion der Spirolactone im Stop-Flow-Experiment.

Bei der Auswertung der Stop-Flow-Untersuchungen haben wir zunächst die in den einzelnen Fraktionen gemessenen Na^+-Konzentrationen zur Charakterisierung des distalen Resorptionsmaximums sowie des proximalen "Plateaus" benutzt. Die Analyse der Konzentration des Spironolactons und seines Umwandlungsproduktes zeigte einen deutlichen Anstieg, der im Bereich des proximalen Plateaus lokalisiert war. Dieser Konzentrationsanstieg spricht dafür, daß die Antialdosterone an dieser Stelle tubulär sezerniert werden (Abb. 6).

Diskussion

Es ist seit langem bekannt, daß die Entfernung der Nebennierenrinde bei zahlreichen Versuchstieren zu einem Na^+-Verlust im Harn führt. (LOEB 1932, 1942 und SWINGLE und REMINGTON 1944). Diese negative Na^+-Bilanz war auch in unseren Versuchen bei Zufuhr von 42,8 µval/Tier · Std. festzustellen. Die Tiere sind unter diesen Bedingungen offensichtlich nicht in der Lage, ihre tubuläre Resorption soweit zu erhöhen, daß sich die Natriumausscheidung im Harn der Zufuhr anpaßt. Dieser Befund ist durch das Fehlen von Aldosteron erklärbar.

Andererseits konnten die Tiere die zugeführten Natriumionen nicht eliminieren, wenn die Zufuhr auf das 4-fache erhöht wurde. Die tubuläre Rückgewinnung ist offenbar größer als zum Ausgleich der Bilanz erforderlich wäre. Dieses Verhalten zeigt, daß die Niere ihre Anpassungsfähigkeit durch den Verlust der Nebennierenrindenhormone verloren hat.

Eine Überschreitung der Kochsalztoleranz fand sich erwartungsgemäß auch in den Versuchen, in denen 770 und 1 027 µval Na^+/Tier · Std. infundiert wurden. Überraschend war jedoch die Feststellung, daß die im Vergleich zur Einfuhr retinierten Na^+-Mengen geringer waren, je höher das Kochsalzangebot in der Infusionsflüssigkeit gewählt wurde. Bei Zufuhr der 1,2%igen NaCl-Lösung war die absolute Na^+-Retention sogar geringer als bei Gabe der 0,9%igen Lösung.

In diesen Versuchen war das Harnminutenvolumen nahezu konstant. Da die als Maß für die glomeruläre Filtration benutzte Inulin-Clearance bei Ratten dem Harnminutenvolumen proportional ist (PETERS 1959), können wir annehmen, daß die glomeruläre Filtration bei Zufuhr der 1,2%igen NaCl-Lösung genauso groß war wie bei der Gabe der 0,9%igen. Die Menge der filtrierten Natriumionen könnte infolgedessen nur um denjenigen Betrag ansteigen, der durch die Erhöhung der Natriumkonzentration in der Infusionsflüssigkeit gegeben ist, d.h. um 30 %. Die Na^+-Ausscheidung im Endharn wurde aber sogar um 67 % vermehrt. Dieser Befund spricht dafür, daß der transtubuläre Na^+-Transport der adrenalektomierten Tiere ein Maximum aufweist, das bei Wechsel der Infusionsflüssigkeit von 0,9 auf 1,2%ige NaCl überschritten wird.

Bei der Analyse der durch die Entfernung der Nebennieren auftretenden Störungen wird deutlich, daß die Tiere in allen Versuchen Wasser retinieren, selbst dann, wenn sie eine negative Na^+-Bilanz haben. Diese Wasserretention nimmt zwar etwas zu, wenn die Tiere unter der Zufuhr der 0,2 und 0,9%igen Kochsalzlösung gleichzeitig Na^+ retinieren, jedoch viel geringer, als man aufgrund der osmotischen Wirkungen der retinierten Natriumionen erwarten könnte. Die reduzierte Wasserausscheidung ist somit als eine von der Störung des Na^+-Transportes unabhängige Folge der Adrenalektomie anzusehen. Diese Differenzierung zeigt sich auch bei der Beseitigung der Funktionsänderung. Sie ist durch Glucocorticoide, nicht aber durch Aldosteron zu beheben (GAUNT, BIRNIE, EVERSOLE (1949), PETERS (1960).

Bei der Deutung der Befunde, daß die Na^+-retinierende Wirkung des Aldosterons mit steigender Kochsalzeinfuhr zunimmt, können wir von der Annahme ausgehen, daß die extrazelluläre Na^+-Konzentration und damit auch die Menge der filtrierten Natriumionen erhöht wird, wenn die Tiere konstante Flüssigkeitsvolumina mit steigender Na^+-Konzentration durch intravenöse Infusion erhalten. Unter diesen Bedingungen werden dem unter dem Einfluß des Aldosterons aktivierten "Pumpmechanismus" auch mehr Natriumionen als "Substrat" angeboten. Die Wirkung des Aldosterons ist in den proximalen und distalen Abschnitten des Nephrons lokalisiert worden. (VANDER und

WILDE (1961), ZEMISCH (1964), WIEDERHOLT, HIERHOLZER, RUMRICH und HOLZGREVE (1964).

Unsere Befunde sprechen dafür, daß ein Teil der unter dem Einfluß des Hormons zusätzlich tubulär resorbierten Natriumionen mit einer Sekretion von Kaliumionen gekoppelt ist. Die kaliumeliminierende Wirkung einer konstanten Hormondosis steigt an, wenn die Na^+-Zufuhr bzw. der Na^+-retinierende Effekt größer wird. Das Verhältnis der hormonal bedingten Na^+-Retention zur K^+-Elimination bleibt dabei mit einem Wert von etwa 6/1 annähernd konstant.

Adrenalektomierte Tiere ohne Aldosteronsubstitution lassen diese Korrelation vermissen. Diese "Entkopplung" wird besonders deutlich, wenn die Natriumeinfuhr erhöht wird. Die Elimination der Kaliumionen steigt viel weniger als die der Natriumionen an.

Ein weiteres Charakteristikum des Aldosteroneffekts läßt sich als Excape-Phänomen beschreiben. Es handelt sich dabei um einen Wirkungsverlust, der trotz kontinuierlicher Hormonzufuhr auftritt. Seine Ursachen sind nicht bekannt.
Für eine vermehrte Inaktivierung durch den Stoffwechsel oder eine gesteigerte renale Elimination bestehen keine Anhaltspunkte.
Befunde, nach denen die Produktion und Inkretion Na^+ eliminierend wirkender Glucocorticoide nach chronischer Zufuhr von Aldosteron ansteigt (EISENSTEIN und HARTROFT 1957) können das unter unseren experimentellen Bedingungen auftretende Escape-Phänomen nicht erklären, da die Versuche an adrenalektomierten Tieren durchgeführt wurden.

Als wichtigste Ursache des Wirkungsverlustes wird in letzter Zeit die Reaktion eines volumenregulatorischen Systems angesehen. Dieser durch zahlreiche Experimente (GAUER und HENRY 1963 - s. dort weitere Literatur) belegte Mechanismus läßt sich aber nicht ohne weiteres zur Deutung der hormonalen Leistungsminderung benutzen. Zunächst scheint nämlich ein adäquater Reiz für die Volumenrezeptoren zu fehlen, da unter dem Einfluß des Aldosterons lediglich Natriumionen retiniert werden, ohne daß das Harnvolumen der

Tiere dabei abnimmt. Es ist aber dennoch durchaus möglich, daß das Plasmavolumen als Folge der Aldosteronzufuhr ansteigt. Die Untersuchungen von DULCE und GÜNTHER (1960), sowie von LOSERT, SENFT und SENFT (1964) haben nämlich gezeigt, daß Aldosteron den Na^+-Transport auch extrarenal beeinflußt, indem es zu einer Abnahme des intrazellulären Na^+-Gehalts bei Steigerung der extrazellulären Na^+-Konzentration führt. Da der Transport von Natriumionen von einer Abnahme des intrazellulären Wassergehalts begleitet ist, kann hierdurch das Volumen des extrazellulären Raumes und damit auch das Plasmavolumen vergrößert werden. Die hierdurch bedingte Reizung der Volumenrezeptoren kann aber nun nicht zu einer Abnahme der Aldosteroninkretion führen, da unsere Experimente an adrenalektomierten Tieren bei konstanter Hormonzufuhr durchgeführt wurden.

Nach den Untersuchungen von GAUER u. Mitarb. (GAUER und HENRY 1963, s. dort weitere Literatur) kann eine Reizung der Volumenrezeptoren eine verminderte Inkretion von ADH bewirken und damit eine Vermehrung der Harnausscheidung bedingen. Auch dieser efferente Teil des Regelkreises wird aber dem in unseren Experimenten gefundenen Excape-Phänomen nicht gerecht. Eine verminderte Ausschüttung von ADH führt zu einer Abnahme der tubulären Rückgewinnung von Wasser bei gleichzeitiger Erniedrigung der Na^+-Konzentration im Harn. In unseren Untersuchungen stieg die Flüssigkeitsausscheidung der Tiere aber nicht an. Die Na^+-Konzentration und die absolute Na^+-Ausscheidung wurden dagegen erhöht. Diese renalen Veränderungen ähneln sogar eher denen, die bei vermehrter Inkretion von ADH zu beobachten sind (HERKEN, SENFT, NATZSCHKA 1961).

Schließlich wäre noch in Erwägung zu ziehen, daß die trotz kontinuierlicher Zufuhr des Aldosterons auftretende Vermehrung der Na^+-Ausscheidung auf einer Steigerung der glomerulären Filtration beruht. Wir konnten aber keinen signifikanten Anstieg des Filtratvolumens zwischen den Phasen der maximalen Na^+-Retention und der gegenregulatorischen Periode beobachten. Der Anstieg der Na^+-Elimination scheint daher im wesentlichen auf einer Reduktion der tubulären Na^+-Rückgewinnung zu beruhen.

Die Untersuchungen von GROSS, BUSCHOR und ZEUGIN (1960) haben gezeigt, daß die renale Elimination von Natriumionen ansteigt, wenn die Renin-Konzen-

tration in der Niere verringert wird. Der Reningehalt der Nieren wird bei Gabe von Mineralocorticoiden herabgesetzt. Es wäre möglich, daß diesem Enzymsystem eine permissive Bedeutung für die Aldosteronwirkung zukommt und der Wirkungsverlust des Aldosterons mit der Abnahme der Renin-Konzentration in Zusammenhang steht.

Andererseits ist es aber auch möglich, daß der Anstieg der Plasma-Na^+-Konzentration, der mit zunehmender Versuchsdauer unter der konstanten Zufuhr des Aldosterons auftritt, zu der Steigerung der Na^+-Ausscheidung beiträgt. Die Erhöhung der extrazellulären Na^+-Konzentration führt nämlich zu einer Vermehrung der filtrierten Na^+-Menge. Übersteigt diese die maximale Transportkapazität der Tubulusepithelien für Natriumionen, so muß die Na^+-Ausscheidung im Harn ansteigen. Diesem Vorgang könnte auch deswegen eine Bedeutung zukommen, weil das Aldosteron wahrscheinlich die maximale tubuläre Transportkapazität nicht steigert, sondern die Geschwindigkeit des Na^+-Transportes erhöht (McEVOY, HOLLMANN, SENFT 1965). Die Annahme eines derartigen zur Limitierung der Aldosteronwirkung führenden Regulationsmechanismus wird auch noch durch die Beobachtung gestützt, nach der das Excape-Phänomen umso früher auftritt, je höher die Na^+-Konzentration der Infusionsflüssigkeit ist.

Die Wirkung der Spirolactone beruht auf einem kompetitiven Antagonismus gegenüber den Mineralocorticoiden bzw. dem Aldosteron. Die Wirkungsintensität des Antialdosterons ist infolgedessen von dem Verhältnis seiner Dosis zu der injizierten Hormonmenge abhängig. Sie richtet sich aber nicht nach der Intensität der hormonal bedingten Na^+-Retention. Bei unseren Experimenten mit dem modifizierten Kagawa-Test stellten wir nämlich fest, daß eine Aldosterondosis von 0,1 µg/Tier bereits eine maximale Na^+-Retention und K^+-Elimination während einer 4-stündigen Versuchsdauer bewirkt. Obwohl höhere Dosen keinen stärkeren Effekt erzielen, nimmt der Na^+-eliminierende Effekt einer konstanten Antialdosterondosis mit steigender Hormondosis kontinuierlich ab. Zu dem gleichen Ergebnis gelangt man bei der Berechnung der Na^+/K^+-Quotienten im Urin.

Der große Dosisunterschied zwischen Antialdosteron und Mineralocorticoiden weist darauf hin, daß die Affinität des Spirolactons zu den Rezeptoren in der

Niere erheblich geringer ist als die des Aldosterons. Man muß dabei allerdings berücksichtigen, daß die applizierten Dosen nicht unbedingt den Relationen entsprechen, die für den kompetitiven Antagonismus beider Substanzen am Wirkungsort zugrunde gelegt werden können.

Bei den Infusionsversuchen beobachteten wir nämlich einen relativ späten Wirkungseintritt sowie einen langsamen Anstieg der Ausscheidung des Spironolactons und seines dethioacetylierten Metaboliten. Dies spricht dafür, daß das Pharmakon bei subcutaner Applikation in öliger Lösung verhältnismäßig langsam resorbiert wird. Es ist daher anzunehmen, daß die im Kagawa-Test gefundenen Dosis-Relationen durch die schlechte Resorption des Spironolacton zu ungunsten des Antialdosterons verschoben sind.

Auf Grund der Clearance-Untersuchungen kann angenommen werden, daß die Spirolactone auf zwei verschiedenen Wegen an den Ort ihrer renalen Wirkung gelangen. Es handelt sich dabei um die glomeruläre Filtration und um eine tubuläre Sekretion der Antialdosterone. Die filtrierten Spirolacton-Mengen sind dabei relativ klein, weil die hohe Eiweißbindung der Substanzen ihre Passage durch die Wand der Glomerulumkapillaren limitiert. Die tubuläre Sekretion vermag dagegen einen relativ hohen Konzentrationsgradienten zwischen dem peritubulären Blut und dem tubulären Harn aufzubauen. Dieser Vorgang läuft im Bereich der proximalen Tubulusepithelien ab, wie in den Stop-Flow-Analysen wahrscheinlich gemacht werden konnte. Daß es sich hierbei um einen aktiven Transport handeln könnte, geht aus dem Befund hervor, nach dem die Sekretion des Spirolactons durch Zufuhr von Bromkresolgrün gehemmt werden kann (BRAUN, 1962; HOLLMANN, SENFT und SENFT, 1964). Da diese Substanz die Sekretion organischer Säuren kompetitiv hemmt, müssen die Spirolactone im Organismus als Säuren vorliegen. Diese Möglichkeit ist in der Aufspaltung des γ -Lacton-Ringes der Androstenderivate gegeben. Die durch die glomeruläre Filtration und tubuläre Sekretion in den Primärharn gelangenden Spirolactonmengen diffundieren zu einem Teil an den distal vom Ort der Sekretion gelegenen Abschnitt des Nephrons zurück. Über diesen Weg gelangen sie an den Ort ihrer Wirkungen, der mit dem des Aldosterons indentisch sein dürfte. Dieser wird an der zum peritubulären Blut gelegenen Membran der Tubulusepithelien angenommen (DULCE und GÜNTHER 1960).

Zusammenfassung

In einem modifizierten Kagawa-Test bestimmten wir die Wirkung steigender Aldosterondosen auf die Na^+- und K^+-Ausscheidung im Urin. Ein maximaler Effekt wurde bereits mit 0,1 µg d-Aldosteron festgestellt. 5 mg Spironolacton heben die Wirkung von 0,05 und 0,1 µg Aldosteron auf. Der Effekt größerer Hormondosen wird durch den Antagonisten nur noch reduziert.

Die Auswirkungen einer Adrenalektomie auf die renale Wasser-, Na^+- und K^+-Ausscheidung wurden bei intravenöser Infusion verschieden konzentrierter Kochsalzlösungen untersucht.

Bei Infusion einer 0,05%igen Kochsalzlösung (428 µval/10 Stunden) ist die Natriumbilanz negativ. Sie wird jedoch positiv, wenn die adrenalektomierten Ratten eine 0,2%ige (1 712 µval/10 Stunden), 0,9%ige (7 700 µval/10 Stunden) oder 1,2%ige (10 272 µval/10 Stunden) NaCl-Lösung erhielten. Die im Vergleich zur Einfuhr auftretende Natriumretention nimmt mit Erhöhung der Kochsalzzufuhr ab. Bei Infusion der 1,2%igen NaCl-Lösung werden sogar absolut weniger Natriumionen retiniert als bei Gabe der 0,9%igen NaCl-Lösung.

Die adrenalektomierten Tiere retinieren unter allen Versuchsbedingungen Wasser. Die Wasserretention ist von der Natriumbilanz primär unabhängig.

d-Aldosteron (0,25 µg/Tier .Std.) reduziert die Natriumausscheidung der adrenalektomierten Tiere. Die hormonale Wirkung tritt nach einer Latenzzeit von 1 Std. auf und erreicht in der vierten Stunde ein Maximum. Danach läßt sie trotz kontinuierlicher Gabe nach. Der Wirkungsverlust tritt umso früher auf, je höher die Natriumkonzentration der Infusionslösung ist. Die hormonal bedingte Natriumretention wird umso größer, je höher die Kochsalzzufuhr mit der Infusionslösung ist.

Der aldosteronantagonistische Effekt des Spironolactons wurde bei Zufuhr einer 0,2%igen NaCl-Lösung geprüft. Die Wirkung des Antihormons tritt erst nach zwei Stunden auf und erreicht in der achten Stunde nach subkutaner Injektion ein Maximum. Zum gleichen Zeitpunkt findet sich auch das Maxi-

mum der renalen Ausscheidung des Spironolactons und seines dethioacetylierten Metaboliten.

Die Spirolactone werden tubulär sezerniert. Stop-Flow-Experimente sprechen dafür, daß dieser Transport in den proximalen Abschnitt des Nephrons lokalisiert ist.

Literaturverzeichnis

BRATTON and MARSHALL (1939) modifiziert von SMITH, H.W., FINKELSTEIN, N., ALIMINOSA, L., CRAWFORD, B. and GRABER, M.: J. Clin. Invest. 24. 288 (1945) zitiert nach SMITH, H.W.: Principles of Renal Physiology N.Y. Oxford University Press 1956.

BRAUN, W.: Untersuchung über den aktiven Transport organischer Säuren und Basen in Nierenschnitten. Habilitationsschrift, Hamburg 1962.

DULCE, H.J. und GÜNTHER, T.: Steuerung des cellulären Elektrolyt- und Wassergehalts durch Hormone. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmak. 238, 368 (1960).

EISENSTEIN, A.B., HARTROFT, P.M. and CODAY, L.: Alterations in the Rat Adrenal Cortex Induced by Sodium Deficiency: Steroid Hormone Secretion. Endocrinology (Springfield, III) 60, 634 (1957). - Zitiert nach: Ber. ges. Physiol. u. Pharmakol. 194, 113 (1957).

GAUER, O.H. and HENRY, J.P.: Circulatory Basis of Fluid Volume Control Physiolog. Reviews, 43, 3 (1963).

GAUNT, R., BIRNIE, J.H. und EVERSOLE, W.J.: Adrenal Cortex and Water Metabolism. Physiol. Reviews 29, 281 (1949).

GAUNT, R., RENZI, A.A. und CHART, J.J.: Aldosterone, A Review J. Clin. Endocrin. a. Metabol. 15, 621 (1955).

GROSS, F., BUSCHOR, O. und ZEUGIN, P.: Renin in the Kidneys of Rats with Aminonucloiside Nephrosis. Amer. J. Physiol. 199, 1 (1960).

GROSS, F.: Extrarenale Wirkungen von Aldosteron. Dtsch. med. Wschr. 86, 1989 (1961).

GROSS, F.: Renal and Extrarenal Actions of Aldosterone. - Experientia, Basel, 17, 57 (1961).

GOCHMAN, N. and GANTT, C. L.: A Fluorimetric Method for the Determination of a Major Spironolactone (Aldactone) Metabolite in Human Plasma. J. Pharmacol. exp. Ther. 135, 312 (1962).

HERKEN, H., SENFT, G. und NATZSCHKA, J.: Untersuchungen über eine Zentralnervöse Regulation des Natriumhaushalts. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 240, 483-494 (1961).

HERKEN, H., SENFT, G. und WILUTZKY, H.: Die Erzeugung von Natrium - und Wasser - Retentionen zur Prüfung der Diuretica. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 229, 123 (1956).

HERKEN, H., SENFT, G., SCHWARZ, W. und MERKER, H. J.: Struktur und Funktion der Glomerula nach Einwirkung von Glucocorticoiden bei der Aminonucleosidnephrose. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 245, 289 (1963).

HOLLMANN, G., WERNER, C., SENFT, G.: Tubuläre Wirkungen und renale Elimination von Spirolactonen. Naunyn Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 247, 419 (1964).

KAGAWA, C. M., SHIPLEY, E. G. and MEYER, R. K.: A Biological Method for Determining Small Quantities of Sodium Retaining Substances. - Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 80, 281 (1952).

KAGAWA, C. M., CELLA, J. A., van ARMAN, C. G.: Actions of New Steroids in Blocking Effects of Aldosterone and Desoxycorticosterone on Salt. Science 126, 1 015 (1957).

KAGAWA, C. M., STURTEVANT, F. M., and van ARMAN, C. G.: Pharmacology of a New Steroid that Blocks Salt Activity of Aldosterone and Desoxycorticosterone. - J. Pharmacol. exp. Ther. 126, 123 (1959).

LIDDLE, G. W.: Sodium Diuresis Induced by Steroidal Antagonists of Aldosterone. Science 126, 1016 (1957).

LIDDLE, G. W.: In "The Clinical Use of Aldosterone - Antagonists." Charles C. Thomas Publishers, Springfield (Illinois).

LOEB, R.: Chemical Changes in the Blood in Addison's Disease. - Science 76, 420 (1932). Zitiert nach PETERS (1960).

LOEB, R.: Adrenal Cortex and Electrolyte Behavior. Bull. N. Y. Acad. Med. 18, 263 (1942). Zitiert nach PETERS (1960).

MALVIN, R. L., SULLIVAN, L. P. and WILDE, W. S.: Stop-Flow-Analysis of Renal Tubular Localisation. Physiologist 1, 58 (1957).

MALVIN, R. L., WILDE, W. S. and SULLIVAN, L. P.: Localisation of Nephron Transport by Stop-Flow-Analysis. Amer. J. Physiol. 194, 135 (1958).

McEVOY, J., HOLLMANN, G. und SENFT, G.: Einfluß von Mineralocorticoiden auf die tubuläre Rückgewinnung von Natriumionen. - Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 250, 318 (1965).

PETERS, G.: Die renale Elektrolytausscheidung normaler und adrenalektomierter Ratten nach intravenösen Salzinjektionen und ihre Beeinflussung durch Corticosteroide. Arch. exper. Path. Pharmak. 235, 185 (1959).

PETERS, G.: In "Nebenniereninkretion und Wasser-Elektrolythaushalt." VEB Georg Thieme-Verlag Leipzig (1960).

SCHOLTAN, W.: Die Bindung der Langzeit-Sulfonamide an die Eiweißkörper des Serums. Arzneimittelforschung 11, 707 (1961).

SIMPSON, S. A., TAIT, J. F., WETTSTEIN, A., NEHER, R., v. EUW, J., REICHSTEIN, T.: Isolierung eines neuen kristallinen Hormons aus Nebennieren mit besonders hoher Wirksamkeit auf den Mineralstoffwechsel. Experientia Basel 9, 333 (1953).

SWINGLE, W. W. and REMINGTON, J. W.: The Role of the Adrenal Cortex in Physiological Processes. Physiol. Rev. 24, 89 (1944).

VANDER, A.J., WILDE, W.S. and MALVIN, R.L.: A Theoretical Mode of Action of Aldosterone, J. Theoretical Biol. 2, 236 (1961).

WAHLER, B.E.: Bestimmung von 2-20 µg Inulin in tierischen Geweben. - Hoppe Seyler's Ztschr. f. physiolog. Chem. 306. Bd. (1956).

WIEDERHOLT, M., HIERHOLZER, K., RUMRICH, G., HOLZGREVE, H.: Transtubuläre Natriumströme im proximalen und distalen Tubulus adrenalektomierter Ratten. - Pflüger's Arch. ges. Physiol. 281, 96 (1964).

WILBRANDT, W.: Permeability and Transport-Systems in Living Cells. J. Pharmacy Pharmacol. 11, 65 (1959).

WILBRANDT, W.: Die Bedeutung der Corticosteroide für Ionentransporte. Schweiz. med. Wschr. 89, 363 (1959).

WILBRANDT, W.: Probleme des aktiven Transports. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 245, 28 (1963).

ZEMISCH, B.: Störungen des Elektrolyt- und Wasserhaushalts nach Bildung abnorm strukturierter NAD-Bzw. NADP-Analoga. Inaugural-Dissertation. Freie Universität Berlin (1963).

LOSERT, W., SENFT, C. und G. SENFT: Extrarenale Wirkungen des Aldosterons und der Spirolactone Naunyn Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharmak. 248, 450 (1964

Abb. 1

Fluorometrische Bestimmung der Spirolactone

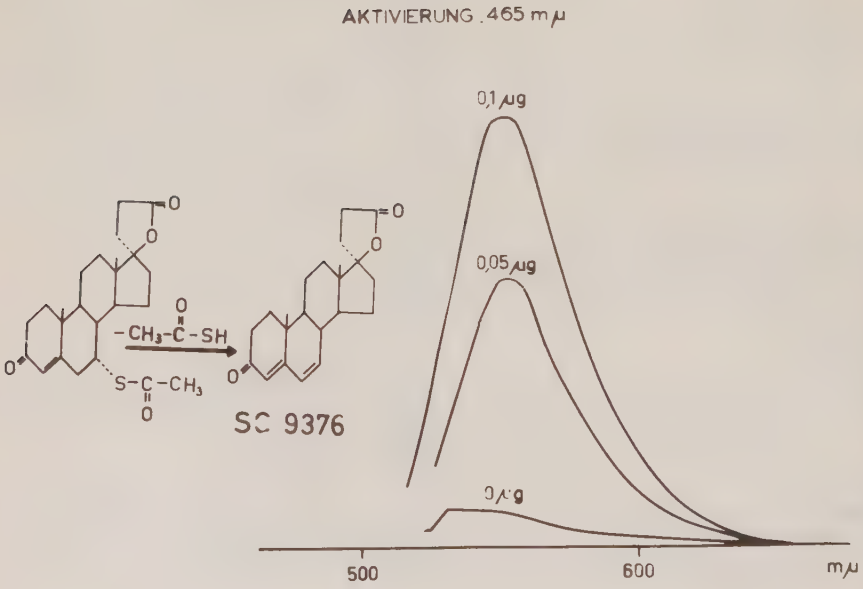
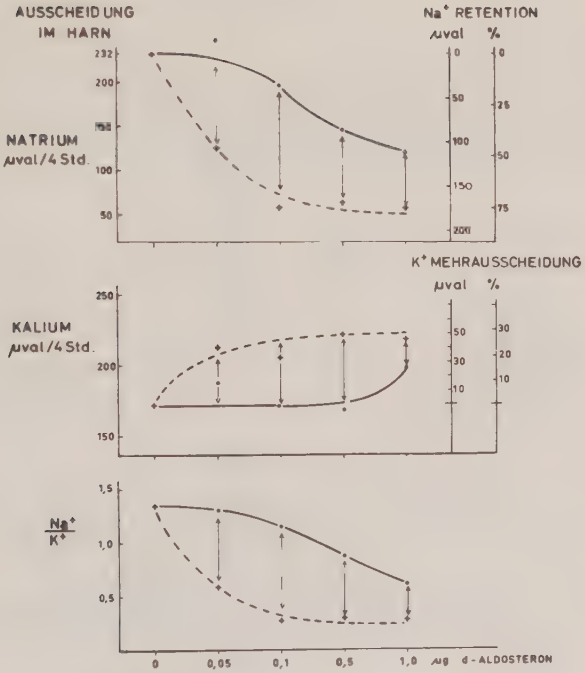


Abb. 2



---d-ALDOSTERON

——SPIRONOLAKTONE (SC 9420)

REDUKTION DER ALDOSTERONWIRKUNG DURCH 6 mg SC 9420

Abb. 3

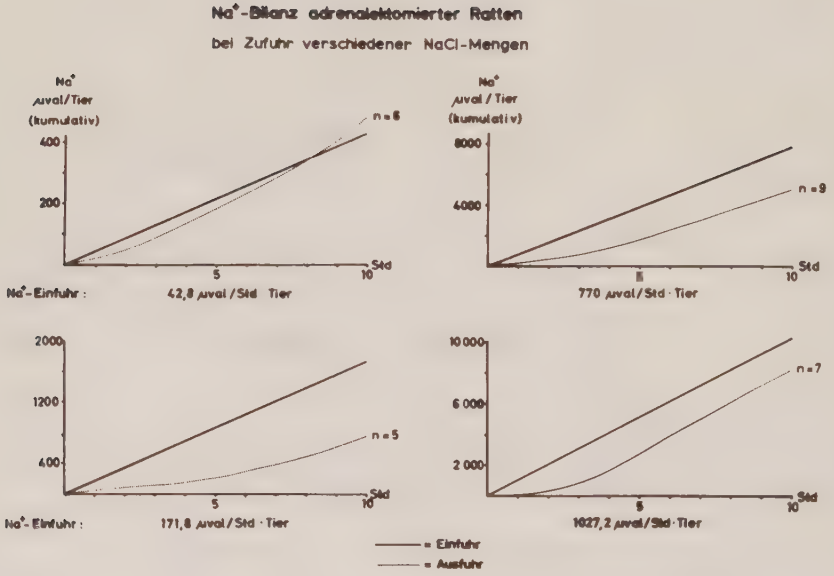
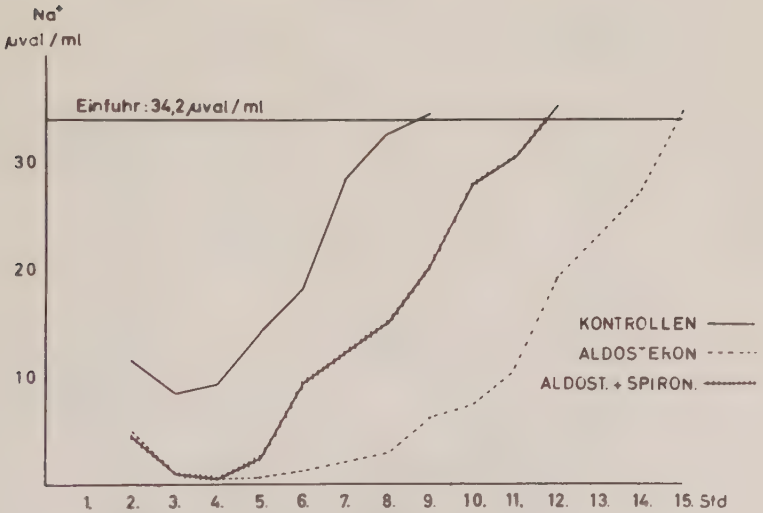
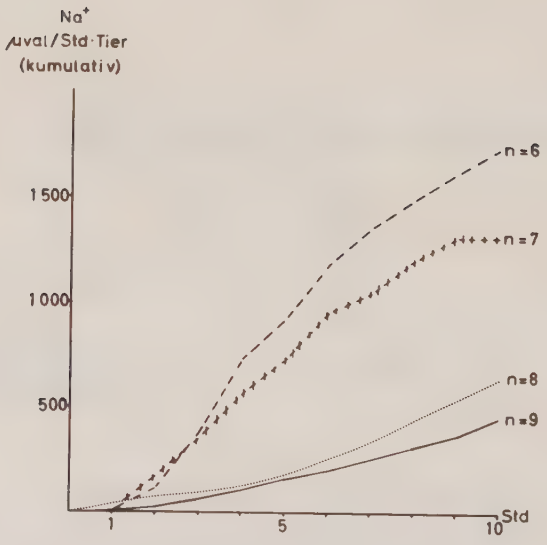

Na⁺-Bilanz adrenalektomierter Ratten
bei Zufuhr verschiedener NaCl-Mengen
Na⁺ µval/Tier (kumulativ)
n = 6
400
200
5
10
Std
Na⁺-Einfuhr: 42,8 µval/Std Tier
Na⁺ µval/Tier (kumulativ)
8000
4000
n = 9
10
Std
770 µval/Std · Tier
2000
1200
400
n = 5
5
10
Std
Na⁺-Einfuhr: 171,8 µval/Std · Tier
10 000
6 000
2 000
n = 7
5
10
Std
1027,2 µval/Std · Tier
= Einfuhr
= Ausfuhr

Abb. 4



ANSTIEG DER Na^+-KONZENTRATION IM HARN
NACH GABE VON ALDOSTERON
bzw ALDOSTERON UND SPIRONOLACTON

Abb. 5



Na⁺-retinierender Effekt

von 0,25 µg d-Aldosteron / Std·Tier

(Na⁺-Ausscheidg. d Kontr. — Na⁺-Ausscheidg. bei Gabe von Aldosteron)

Na⁺-Einfuhr: ——— = 42,8 µval / Std·Tier

..... = 171,8 µval / Std·Tier

+++++ = 770,0 µval / Std·Tier

– – – – – = 1027,2 µval / Std·Tier

Abb. 6

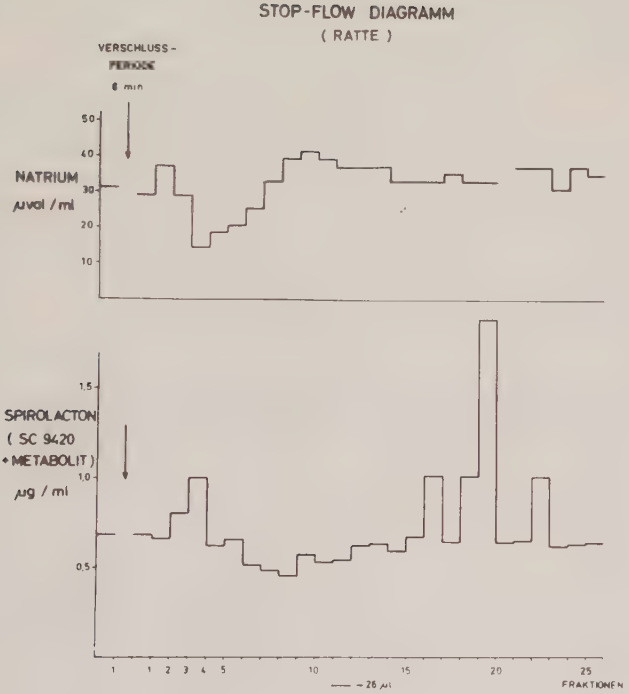

STOP-FLOW DIAGRAMM
(RATTE)
VERSCHLUSS-
PERIODE
6 min
NATRIUM
µval / ml
50
40
30
20
10
SPIROLACTON
(SC 9420
+METABOLIT)
µg / ml
1,5
1,0
0,5
1
1 2 3 4 5
10
15
20
25
FRAKTIONEN
= 26 µl

Tabelle 1

Einfluß der Kochsalzzufuhr auf die Natriumausscheidung adrenalektomierter Ratten

NaCl-Konzentration i.d.Infusionslsg. g/100 ml	0,05	0,2	0,9	1,2
Einfuhr Na^+ /uval/Tier • 10 Std.	428	1712	7700	10272
Ausscheidung Na^+ /uval/Tier • 10 Std.	482,3	766,5	4924,9	8241,8
Retention Na^+ /uval/Tier • 10 Std.	--	945,5	2775,1	2030,2
Retention Na^+ in % der Einfuhr	--	55,2	36,0	19,8
Ausscheidung K^+ /uval/Tier • 10 Std.	204,9	401,4	552,3	701,4
$\frac{\text{Ausscheidung } Na^+}{\text{Ausscheidung } K^+}$	2,35	1,91	8,92	11,75
Einfuhr H_2O minus extraren. Verl. ml/Tier • 10 Std.	47	47	47	47
Ausscheidung H_2O ml/Tier • 10 Std.	38,9	34,4	30,1	31,8

Tabelle 2

Einfluß von d-Aldosteron auf die Na^+-, K^+- und H_2O-Ausscheidung adrenalektomierter Ratten

NaCl-Konzentration i. d. Infusionslösg. g/100 ml	0,05	0,2	0,9	1,2
Einfuhr Na^+ /uval/Tier · 10 Std.	428	1 712	7 700	10 272
Ausscheidung Na^+ /uval/Tier · 10 Std.	38,2	128,6	3 624,9	6 516,4
Na^+-retin. Effekt (Kontr. - Aldosteron) /uval/Tier · 10 Std.	444,1	637,9	1 300,0	1 725,4
Na^+-retin. Effekt in % der Einfuhr	104	37	16,9	16,8
Ausscheidung K^+ /uval/Tier · 10 Std.	265,3	505,8	748,6	982,0
K^+-elimin. Effekt (Aldosteron-Kontr.) /uval/Tier · 10 Std.	60,4	104,4	196,3	280,6
Ausscheidung Na^+ / Ausscheidung K^+	0,14	0,25	4,84	6,63
Na^+-retin. Effekt / K^+-elimin. Effekt	7,35	6,11	6,62	6,15
Ausscheidung H_2O ml/Tier · 10 Std.	35,5	35,1	24,7	25,3

Tabelle 3

Einfluß von d-Aldosteron auf die tubuläre Rückgewinnung von Natriumionen

	Kontrolle 3 Std. n= 7	Aldosteron 3 Std. n= 7	Aldosteron 20 Std. n= 6
GFR ml/Tier · min.	0,72	0,79	0,83
Glom. filtr. Na^+ /uval/Tier · min.	89,0	119,4	125,7
Tub. resorb. Na^+ /uval/Tier · min.	88,56	119,31	124,22
in % d. filtr. Na^+	99,951	99,999	99,88
Na^+-Ausscheidg. i. Harn /uval/Tier · min.	0,437	0,089	1,48

T A B E L L E 4

Einfluß von Spironolacton auf die Na^+-retinierende Wirkung des d-Aldosterons

	Ausscheidung H_2O ml/Std.			Ausscheidung Na μ val/Std. I	II	III	Aldosteron Effekt	Spirono-lacton Effekt	Spirono-lacton Ausscheidg.
	Kontr.	Aldo.	Aldo+Spiro.	Kontr.	Aldo.	Aldo+Spiro.	I-II	III-II	μg/Tier Std.
1.Std.	2,2	2,6	1,5	69,3	32,7	33,3	36,6	0,6	
2."	3,4	3,3	2,9	40,4	5,5	14,9	34,9	9,4	
3."	3,4	3,2	3,0	28,9	3,0	3,6	25,9	0,6	0,5
4."	3,2	2,9	2,9	31,0	1,8	1,7	29,6		1,4
5."	3,7	3,7	3,2	55,6	2,8	9,5	52,8	6,7	2,6
6."	4,3	3,8	3,4	82,0	5,3	38,2	76,7	32,9	3,3
7."	4,4	3,7	3,8	89,6	8,8	52,2	80,8	43,4	4,2
8."	4,0	4,1	3,1	112,7	13,5	47,7	99,2	34,2	3,9
9."	4,2	4,4	3,9	125,7	27,9	79,3	97,8	51,4	4,8
10."	3,4	3,4	3,6	131,3	27,3	106,0	104,0	78,7	4,7
11."	4,0	4,3	3,9	157,8	50,7	119,4	107,2	68,8	4,6
12."	3,5	3,6	3,7	152,0	73,0	130,6	79,0	57,6	4,9
13."	4,3	3,4	3,8	163,5	82,0	126,9	81,5	44,9	4,7
14."	5,1	4,3	3,9	180,8	122,7	155,2	58,1	32,5	5,0
15."	4,1	3,8	4,1	172,4	135,4	135,5	37,0	0,1	3,6
16."	3,6	4,2	3,9	141,2	155,7	137,5	14,5		3,7
17."	3,7	3,7	4,6	138,2	126,7	161,4	12,7	35,9	3,8
18."	3,7	3,8	3,6	136,5	119,0	144,8	17,5	25,8	2,6
19."	4,2	4,0	3,8	149,4	108,8	156,8	40,6	48,0	2,7
20."	4,0	3,7	3,6	141,4	102,8	138,9	38,6	36,1	1,9

T A B E L L E 5

	Spirolactone				
Filtriertes Plasma-Volumen ml/min	Konzentration der nicht an Eiweiß gebundenen µg/ml	I Glomerulär Filtrierte	II Im Harn Ausgeschieden. µg/Tier • min	Tubulär Sezernierte	Quotient $\frac{\text{II}}{\text{I}}$
1,14	0,03	0,0342	0,199	0,0848	3,48

Renale Elimination der Spirolactone

(n = 8)

Zum Schluß gestatte ich mir, Herrn Professor Dr. H. Herken für die freundliche Überlassung des Themas sowie Herrn Priv. Doz. Dr. G. Senft für die Anleitung zu den Versuchen und die Mühe bei der Durchsicht der Arbeit meinen Dank auszusprechen.

Lebenslauf

Ich wurde am 15. Februar 1937 als Sohn des Taxiunternehmers Karl Marx und seiner Ehefrau Elly, geb. Winkel in Berlin geboren. Meine Einschulung erfolgte 1943 in Groß-Machmin bei Stolp in Pommern. Von 1949 an besuchte ich den humanistischen Zweig der Menzelschule in Berlin Tiergarten, wo ich im Frühjahr 1956 die Reifeprüfung bestand. Im Sommersemester des gleichen Jahres begann ich das Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin, und bestand hier am 30. Oktober 1958 die ärztliche Vorprüfung und am 12. April 1962 die ärztliche Prüfung.

Nach Beendigung der Medizinalassistentenzeit besitze ich seit dem 4. Juni 1964 die Bestallung als Arzt. Ich bin zur Zeit mit der Wahrnehmung der Stelle eines wissenschaftlichen Assistenten am Strahleninstitut und -Klinik der Freien Universität Berlin, Leiter Professor Dr. H. Oeser, betraut.